

Pemisahan Spermatozoa Berkromosom X dan Y Kambing Boer dan Aplikasinya Melalui Inseminasi Buatan Untuk Mendapatkan Jenis Kelamin Anak Sesuai Harapan

(Separation of spermatozoa with x and y chromosome at boer goat and its application by artificial insemination for kid sex purpose)

Dasrul¹, M. Aman Yaman² dan Zulfan²

¹Laboratorium Reproduksi FKH Universitas Syiah Kuala Darussalam Banda Aceh

²Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian, Universitas Syiah Kuala Darussalam Banda Aceh

ABSTRACT The purposes of this experiment are to investigate the separation of X and Y spermatozoa by measuring the spermatozoa quality, sex ratio between X and Y, capacity of fertility indicated by conception rate and sex ratio of goat boar kids. Samples, used in this experiment, are fresh semen from Boer goat with high quality consists of 4 group treatments with 6 replications 1) group of spermatozoa without separation (control), 2) group of spermatozoa separated by percoll gradient density centrifugation 3 levels (P1), 5 levels (P2) and swine up (P3). The observed parameters are spermatozoa quality, X and Y spermatozoa ratio, fertility's capacity and sex ratio on the birth. Quality examination of spermatozoa and identify X and Y spermatozoa is based on the standard method of WHO. The conception rate was based on the ratio of pregnant goat after the first insemination. Data of spermatozoa quality and spermatozoa ratio were analyzed by using analisis of variance (ANOVA) and further analysis by LSD if there were differences between treatments. The results of this experiment showed that spermatozoa

quality Boer goat significantly reduced ($p < 0,05$) after separation with percoll gradient density centrifugation and swim up. Percentage spermatozoa X after percoll gradient density centrifugation was significantly higher ($P < 0,05$) compared to control and *swim up*. Meanwhile, the Y spermatozoa population was significantly higher ($P < 0,05$) after *swim up* treatment compared to percoll gradient density centrifugation and control. The percentage of sex ratio (male: female) after insemination from percoll gradient density centrifugation produced more female than male. On the other hand, insemination from swim up produced more male than female. Sex ratio produced from separation of percoll gradient density centrifugation, swim up was difference from control semen ($P < 0,05$). From this experiment, it was concluded that spermatozoa separation by percoll gradient density centrifugation and *swim up* can be used as one of the methods to separate X and Y spermatozoa and further can be applied to get preferred sex animals.

Key words: Spermatozoa, goat boer, percoll gradient density centrifugation, swim up, ratio sex

2013 Agripet : Vol (13) No. 1 : 6-15

PENDAHULUAN

Kambing merupakan salah satu jenis ternak yang banyak dikembangkan oleh masyarakat di Propinsi Aceh. Namun demikian populasi dan mutu genetik ternak kambing cenderung menurun dari tahun ke tahun. Tingginya tingkat penurunan populasi ternak kambing ini selain disebabkan oleh tingginya tingkat pematangan, juga disebabkan

pengelolaan yang kurang baik yang berakibat rendahnya tingkat produktivitas ternak kambing (Anonimus, 2003). Salah satu upaya yang efektif dan efisien untuk peningkatan produktivitas ternak kambing dapat dilakukan melalui pemanfaatan teknologi reproduksi inseminasi buatan (IB) (Beconi *et al.*, 1993; Brandeis and Manuel, 1993). Penerapan teknologi IB ini akan lebih berdaya guna lagi, bila anak yang akan dilahirkan dapat ditentukan jenis kelaminnya sesuai dengan tujuan peternakan, misalnya pada peternakan

Corresponding author : dasrul.darni@yahoo.com

kambing penghasil susu akan lebih mengharapkan kelahiran anak betina dari suatu perkawinan dibanding anak jantan, tetapi sebaliknya bagi peternak kambing pedaging tentunya akan lebih mengharapkan kelahiran anak jantan dibanding anak betina (Brandeis and Manuel, 1993; Check *et al.*, 2000). Untuk mencapai tujuan tersebut dapat dilakukan dengan cara menginseminasi seekor betina birahi dengan spermatozoa yang sudah dipisahkan (spermatozoa X dan spermatozoa Y). Pada mammalia, spermatozoa X bila berhasil membuahi sel telur akan menghasilkan anak berjenis kelamin betina (XX), sebaliknya bila spermatozoa Y membuahi sel telur akan menghasilkan anak berjenis kelamin jantan (XY) (Hafez, 2004).

Sentrifugasi gradien densitas percoll merupakan metode pemisahan spermatozoa yang didasarkan atas perbedaan densitas spermatozoa sebagai indikasi dari perbedaan massa dan ukuran spermatozoa X dengan Y Kaneko *et al.* (1983). Massa dan ukuran spermatozoa X lebih besar daripada spermatozoa Y, bila disentrifugasi lebih cepat turun ke lapisan bawah dibandingkan dengan spermatozoa Y (Dasrul *et al.*, 2000^a; Dasrul, 2002). Pada sisi lain peningkatan konsentrasi medium percoll akan meningkatkan viskositas dan densitas yang diharapkan dapat memperbesar jarak dan daya seleksinya (Dasrul, 2005). Telah terbukti bahwa spermatozoa yang dipisahkan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diperoleh populasi spermatozoa X lebih banyak secara sangat nyata pada lapisan bawah dibandingkan dengan populasi spermatozoa Y. Sebaliknya populasi spermatozoa Y yang diperoleh pada lapisan atas lebih banyak secara sangat nyata dibandingkan dengan populasi spermatozoa X (Safei, 1990; Hossifien de Lima *et al.*, 1999; Check *et al.*, 2000 dan Dasrul *et al.*, 2000^b). Hasil penelitian pada spermatozoa kerbau lumpur yang dipisahkan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 6 tingkat (1,030 – 1,070 g/ml) dengan kecepatan 2250 rpm selama 10 menit, diperoleh spermatozoa X sebanyak $83,33 \pm 3,76$ % dan spermatozoa Y sebanyak $16,67 \pm 4,12$ % pada lapisan bawah, setelah fertilisasi *in vitro* (FIV) diperoleh

embrio berjenis kelamin betina sebanyak $72,56 \pm 6,67$ % dan embrio berjenis kelamin jantan sebanyak $27,43 \pm 3,83$ % (Dasrul, 2005). Hasil yang hampir sama juga dilaporkan oleh Susilawati *et al.* (2000) pada spermatozoa Sapi FH yang dipisahkan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 tingkat (1,036 – 1,070 g/ml) dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit, diperoleh pada lapisan bawah populasi spermatozoa X sebanyak 83,1 % dan populasi spermatozoa Y sebanyak 16,9 %. Setelah inseminasi pada induk betina didapatkan anak berjenis kelamin betina sebanyak 82,5 % dan berjenis kelamin jantan sebanyak 17,5 %. Namun sampai saat ini pemisahan spermatozoa pada kambing Boer dengan menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll belum banyak dilaporkan. Sehubungan dengan hal tersebut telah dilakukan suatu penelitian upaya pemisahan spermatozoa X dan Y kambing Boer dengan menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll dan aplikasinya melalui IB untuk mendapatkan anak berjenis kelamin seragam. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas, dan daya fertilitas spermatozoa kambing Boer yang telah mengalami pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dan *swim up*. Hasil penelitian ini diharapkan akan dapat dijadikan patokan dalam menemukan suatu metode pemisahan spermatozoa yang tepat untuk meningkatkan tingkat keberhasilan IB dan dapat diaplikasikan secara seksama, khususnya pada ternak kambing.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilakukan di exfarm Peternakan dan laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Darussalam - Banda Aceh sejak bulan April - September 2008

Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah kandang, seperangkat elektroejakulator, mikroskop biokuler, mikroskop fase kontras, centrifuge, pipet tetes, gunting, termos es, *water bath*, mikropipet, pemanas bunsen,

backer glass, object glass, stopwatch, labu erlenmeyer, tabung reaksi, tabung centrifuge, kertas tissue, haemocytometer, refrigerator, camera digital Canon, kertas saring

Bahan yang di gunakan adalah semen segar kambing Boer, medium percoll isotonis, medium *earle's balance salt solution* (EBSS), *bovine serum albumin* (BSA), natrium sitrat, susu skim, Na Cl fisiologis, alkohol, minyak emersi, eosin-nigrosin, aquadest, kuning telur, gliserol, larutan hypoosmotik 0,032 M (dibuat dari 7,35gr Na Citrat 2H₂O, 13,52gr fruktosa yang dilarutkan dalam 1 liter aquades),

Prosedur Penelitian

1. Pembuatan medium gradien densitas percoll

Gradien densitas percoll yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari 90 %; 60 % dan 30 % (3 tingkat) dan 90 %; 75 %; 60 %; 45 % dan 30 % (5 tingkat). Kemudian larutan dari berbagai densitas tersebut disusun dalam tabung ukuran 15 ml secara berurutan dari densitas yang tertinggi sampai terendah masing-masing 2,0 ml (3 tingkat) dan 1,2 ml (5 tingkat), volume total masing-masing adalah 6 ml.

2. Penampungan Semen

Sampel semen yang akan digunakan diambil dari Kambing Boer jantan, sehat berumur 3 – 4 tahun dengan cara penampungan menggunakan vagina buatan. Penampungan semen dilakukan pada pagi hari jam 8.00 – 9.00 WIB, sebanyak 1 kali dalam seminggu.

Segera setelah penampungan semen, dilakukan pemeriksaan kualitas secara makroskopis dan mikroskopis. Semen yang mempunyai konsentrasi spermatozoa $> 600 \times 10^6/\text{ml}$ dan motilitas progresif $> 70 \%$, abnormalitas $< 20 \%$ digunakan sebagai sampel. Sampel semen tersebut selanjutnya diencerkan dengan medium EBSS yang dilengkapi dengan 5 % serum sapi betina birahi dengan perbandingan 1 : 2 dan dimasukkan dalam tabung untuk perlakuan selanjutnya.

3. Pemisahan Spermatozoa

3.1. Sentrifugasi Gradien densitas Percoll

Sebanyak 1 ml suspensi semen dimasukkan dalam tabung yang sudah diisi medium percoll 3 tingkat gradien, selanjutnya sentrifugasi pada kecepatan 2250 rpm selama 10 menit pada temperatur kamar. Setelah sentrifugasi bagian paling atas dibuang dan tinggalkan 1/3 bagian bawah. Selanjutnya masukan dalam tabung reaksi steril lainnya digunakan sebagai sampel penelitian ini. Masing-masing tabung tersebut diresuspensi dengan 3 ml medium EBSS dan sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit untuk proses pencucian. Selanjutnya buang supernatannya dan pellet yang tertinggal diresuspensi lagi dengan 3 ml medium EBSS, sentrifugasi lagi dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit untuk proses pencucian kedua. Buang supernatannya dan pellet diresuspensi dengan medium EBSS, lalu biarkan selama 10 menit untuk *swim up*, amati kualitas fungsional spermatozoanya.

3.2. Swim up

Medium yang digunakan untuk *swim up* adalah medium EBSS. Sebanyak 3 ml medium dipipet dan masukkan dalam tabung sentrifugasi yang telah berisi semen kambing segar 1 ml secara hati-hati melalui dinding tabung. Kemudian tabung yang sudah berisi tersebut dimiringkan dengan sudut kemiringan 45 °C dan inkubasikan selama 1 jam pada suhu 30 menit. Selanjutnya kembalikan secara hati-hati kearah posisi berdiri dan ambil lapisan paling atas sebanyak 1 ml. untuk pengamatan paramater.

4. Pemeriksaan Kualitas Spermatozoa

Pemeriksaan kualitas spermatozoa yang diamati pada penelitian ini meliputi konsentrasi spermatozoa, motilitas, viabilitas dan integritas membran plasma spermatozoa. Pemeriksaan konsentrasi, motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh spermatozoa dilakukan dengan mengacu pada metode standar yang digunakan BIB Singosari Malang (Zenichero dkk. 2002).

5. Identifikasi Spermatozoa berkromosom X dan Y

Identifikasi populasi spermatozoa berkromosom X dan spermatozoa berkromosom Y dilakukan dengan menggunakan metode pengukuran diameter kepala spermatozoa (Hafez, 2004).

6. Uji Daya Fertilitas Spermatozoa Hasil Pemisahan:

Pemeriksaan daya fertilitas spermatozoa hasil pemisahan spermatozoa segar kambing Boer dilakukan dengan cara menginseminasikan pada induk betina birahi. Sebagai indikator keberhasilan diamati angka konsepsi, angka kelahiran dan rasio jenis kelamin anak yang dilahirkan. Penilaian angka konsepsi didasarkan pada perbandingan jumlah induk betina bunting setelah inseminasi pertama, yang ditentukan berdasarkan diagnosa kebuntingan melalui cara mengamati tidak timbulnya kembali birahi pada induk setelah 21 hari pasca inseminasi. Angka konsepsi sesudah inseminasi ditentukan dengan menggunakan rumus;

$$CR = \frac{\Sigma \text{ betina bunting IB pertama}}{\Sigma \text{ betina yang di IB}} \times 100 \%$$

Sedangkan penilaian rasio jenis kelamin anak yang terlahir dilakukan dengan menggunakan rumus ;

$$\text{Anak jantan/betina (\%)} = \frac{\Sigma \text{ anak (jantan/betina)}}{\Sigma \text{ seluruh anak yang lahir}} \times 100 \%$$

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola searah dengan 3 kelompok perlakuan (kontrol, sentrifugasi gradien densitas percol 3 tingkat dan swim up), tiap kelompok diulang sebanyak 6 kali. Data kualitas spermatozoa dan rasio kromosom spermatozoa, yang diperoleh dianalisa dengan uji ANOVA, dan bila terdapat perbedaan, maka selanjutnya dilakukan uji berganda Duncan, sedangkan angka konsepsi dan rasio

jenis kelamin anak diuji dengan menggunakan uji *x square* menggunakan uji kontingensi 2 x 2 (Steel dan Torrie, 1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar Kambing Boer

Hasil pemeriksaan kualitas semen segar kambing Boer setelah koleksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata (\pm SD) Kualitas Semen Segar Kambing Boer Setelah Koleksi.

Jenis pengamatan	Hasil Pengamatan
Volume (ml)	1,65 \pm 0,15
Warna	Krem keputih-putihan
Konsistensi	Kental
Gerak massa	+++
pH	6,53 \pm 0,15
Motilitas (%)	76,67 \pm 5,77
Konsentrasi (10 ⁹ / ml)	2.17 \pm 0,08
Persentase spermatozoa hidup (%)	88,0 \pm 2,0
Abnormalitas (%)	6,38 \pm 1,96
Integritas Membran (%)	73,67 \pm 3,58

Berdasarkan hasil penilaian semen segar pada Tabel 1 diatas, dapat disimpulkan bahwa kualitas semen segar kambing Boer yang digunakan pada penelitian ini mempunyai kategori baik dan memenuhi syarat digunakan sebagai sampel semen untuk dibekukan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Suyadi (2000) bahwa terdapat beberapa persyaratan yang harus dipenuhi agar semen kambing Boer layak untuk diolah yaitu perkiraan motilitas minimal 70 %, konsentrasi lebih dari 1 x 10⁹ per milliliter semen, persentase hidup spermatozoa minimal 75 %, abnormalitas tidak lebih dari 20 % dan semen memiliki gerakan massa ++/+++

Kualitas Spermatozoa Kambing Boer Setelah Perlakuan Pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll dan Swim up

Rata-rata kualitas spermatozoa yang terdapat dalam kontrol dan setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dan swim up terlihat pada Tabel 2.

Tabel. 2. Rata-rata (\pm SD) Kualitas Spermatozoa setelah Pemisahan dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll dan *Swim Up*

No	Perlakuan	Konsentrasi Spermatozoa ($\times 10^7$ /ml semen)	Persentase Motilitas Spermatozoa (%)	Persentase MPU Spermatozoa (%)
1	(K0)	258,83 \pm 19,498 ^a	83,67 \pm 3,83 ^a	80,83 \pm 2,04 ^a
2	(P1)	169,83 \pm 15,289 ^b	77,33 \pm 4,18 ^b	78,50 \pm 1,97 ^a
3	(P2)	197,67 \pm 9,395 ^c	75,50 \pm 1,38 ^b	75,83 \pm 4,02 ^b
4	(P3)	128,50 \pm 7,969 ^d	82,00 \pm 4,47 ^a	85,00 \pm 3,74 ^{cb}

Keterangan : Nilai konsentrasi yang diikuti dengan superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

a. Konsentrasi Spermatozoa

Rata-rata konsentrasi spermatozoa kambing Boer menurun setelah perlakuan pemisahan baik dengan sentrifugasi gradien densitas percoll, maupun *swim up*. Konsentrasi spermatozoa terendah ditemukan pada perlakuan *swim up* yaitu $128,50 \pm 7,969 \times 10^7$ /ml semen (Tabel 2). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa konsentrasi spermatozoa/ml pada kontrol lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan P1, P2 dan P3. Konsentrasi spermatozoa pada perlakuan P2 lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan P1 dan P3. Konsentrasi spermatozoa pada perlakuan P1 lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan P3.

Rendahnya konsentrasi spermatozoa pada kelompok perlakuan pemisahan dengan *swim up* disebabkan oleh karena semen yang dicacah sudah diencerkan terlebih dahulu. Disamping itu pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat menyebabkan terpisahnya spermatozoa normal dengan abnormal dan spermatozoa motil dengan yang tidak motil. Spermatozoa normal dan motil akan mampu menembus lapisan percoll selama proses sentrifugasi sedangkan spermatozoa abnormal dan immotil akan tersaring atau tidak mampu menembus gradien percoll. Dengan demikian jumlah spermatozoa yang terdistribusi kelapisan bawah menjadi lebih sedikit. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan Mirajuddin (1997) bahwa jumlah spermatozoa yang masuk ke lapisan percoll berkonsentrasi yang lebih tinggi hanya spermatozoa yang motil dan normal. Lain halnya dengan perlakuan pemisahan dengan

swim up, rendahnya perolehan konsentrasi spermatozoa disebabkan karena metode ini hanya mengandalkan kemampuan motilitas spermatozoa untuk bermigrasi keatas dalam waktu selama 15 – 30 menit. Sementara spermatozoa yang tidak mampu berenang kepermukaan atas tidak ikut terambil, sehingga konsentrasi spermatozoa yang terhitung menjadi sedikit.

b. Persentase Motilitas Spermatozoa

Rata-rata persentase motilitas spermatozoa kambing Boer menurun setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll, namun meningkat setelah perlakuan *swim up* (Tabel 2). Hasil analisis statistik, menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa kontrol lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan P1 dan P2, tidak berbeda secara nyata ($P > 0,05$) dibanding dengan perlakuan *swim up*. Persentase motilitas spermatozoa setelah perlakuan *swim up* lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan P1 dan P2, sedangkan persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan P1 lebih rendah secara tidak nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan P2. Hasil ini membuktikan bahwa perlakuan pemisahan spermatozoa dengan *swim up* dapat meningkatkan persentase motilitas spermatozoa, sedangkan perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll menyebabkan penurunan persentase motilitas spermatozoa kambing peranakan Boer.

Meningkatnya persentase motilitas spermatozoa setelah proses pemisahan dengan metode *swim up* sangat wajar terjadi karena spermatozoa yang dihitung merupakan spermatozoa yang mampu berenang ke bagian atas. Spermatozoa ini sudah terpisah dari spermatozoa immotil dan abnormal atau spermatozoa yang teraglutinasi. Faktor lain yang ikut menyebabkan peningkatan persentase motilitas spermatozoa setelah perlakuan pemisahan dengan *swim up* diakibatkan oleh penambahan medium EBSS dalam plasma seminalis. EBSS merupakan medium pengencer yang banyak mengandung protein dan mineral seperti kalsium yang penting untuk induksi kapasitas dan reaksi

akrosom spermatozoa. Diduga pada proses *swim up* spermatozoa tersebut sudah mengalami kapasitasi dini. De Jonge (2005) menyatakan bahwa spermatozoa yang mengalami kapasitasi ditandai dengan terjadinya peningkatan metabolisme dan spermatozoa menjadi hiperaktivasi atau bergerak lebih progresif. Sebaliknya persentase motilitas spermatozoa yang ditemukan setelah perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol maupun *swim up*. Rendahnya persentase motilitas spermatozoa setelah proses pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll ini sangat wajar terjadi karena spermatozoa telah mengalami serangkaian perlakuan mulai proses pemisahan hingga proses pencucian yang membutuhkan banyak energi untuk tetap menormalkan kondisi fisiologisnya. Terpisahnya plasma seminalis dari spermatozoa, merupakan salah satu faktor yang menyebabkan menurunnya nilai motilitas spermatozoa, bila dihubungkan dengan ketersediaan energi bagi spermatozoa. Plasma seminalis selain merupakan medium transportasi bagi spermatozoa juga banyak mengandung komponen-komponen elektrolit yang dapat menstimulir metabolisme untuk menghasilkan sejumlah energi berupa ATP untuk pergerakan spermatozoa. Mengingat metabolisme spermatozoa sangat dipengaruhi oleh kemampuan metabolisme energi yang ditunjang oleh lingkungan antara lain temperatur dan komponen yang terdapat dalam medium ekstraselluler. Sehingga dengan keterbatasan energi endogen yang dimilikinya dan eksogen yang dapat digunakan dari medium ekstraselluler mempengaruhi daya gerak spermatozoa. Selain itu menurunnya motilitas spermatozoa setelah proses pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll juga dapat diakibatkan oleh terjadinya gesekan antara partikel percoll dengan spermatozoa pada waktu sentrifugasi, sehingga akan merangsang terjadinya kerusakan membran spermatozoa. Rusaknya membran plasma spermatozoa ini menyebabkan proses metabolisme menjadi terganggu, sehingga ATP

sebagai sumber energi spermatozoa menjadi rendah (Susilawati, 2000).

Meskipun secara umum terjadi penurunan persentase motilitas spermatozoa setelah proses pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll, namun penurunan tersebut tidak sepenuhnya disebabkan oleh interaksi antara spermatozoa dengan medium percoll dan pengaruh negatif dari sentrifugasi, tetapi juga diakibatkan oleh perubahan lingkungan medium pengencer. Hal ini dapat dibuktikan melalui percobaan terhadap spermatozoa yang dibiarkan dalam medium EBSS tanpa mengalami pemisahan persentase spermatozoa hidup juga menurun dari 85,00 % menjadi 72,50 % setelah dibiarkan selama 1 jam dengan suhu yang sama pada proses pemisahan.

c. Persentase Integritas Membran Plasma Uterus Spermatozoa

Rata-rata persentase membran plasma uterus (MPU) spermatozoa kambing Boer juga mengalami penurunan setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll, sedangkan pada perlakuan *swim up* mengalami peningkatan (Tabel 2). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan pemisahan spermatozoa berpengaruh secara nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase MPU spermatozoa kambing Boer. Persentase MPU spermatozoa pada kelompok P3 lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan P0, P1 dan P2. Persentase MPU spermatozoa pada kelompok P0 lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan P2 dan lebih tinggi secara tidak nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan P1. Persentase MPU spermatozoa pada kelompok P1 lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok P2. Hasil ini membuktikan bahwa perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat menurunkan persentase MPU spermatozoa kambing boer.

Menurunnya persentase MPU spermatozoa kambing peranakan boer setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll terjadi akibat pengaruh gesekan antara permukaan membran spermatozoa dengan partikel percoll atau

dinding tabung selama proses pemisahan. Gesekan mekanik yang terjadi antara permukaan membran spermatozoa dengan partikel percoll dan dinding tabung selama proses sentrifugasi dapat menyebabkan deformasi matrik ekstraselluler termasuk

perubahan komposisi lipid membran yang penting untuk mempertahankan permeabilitas dan fluiditas membran spermatozoa (Guzman *et al.*, 2001). Kemungkinan lain menurunnya persentase MPU spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll juga dapat dipicu oleh terpisahnya plasma seminalis dari spermatozoa. Hal ini sejalan dengan pernyataan peneliti terdahulu bahwa membran plasma spermatozoa akan menjadi kurang stabil bila spermatozoa terpisah dengan plasma seminalis (Dasrul, 2005). Plasma seminalis diketahui banyak mengandung bahan-bahan nutrisi bagi spermatozoa juga mengandung bahan elektrolit dan non elektrolit seperti ion natrium, kalium, protein dan asam askorbat yang penting untuk melindungi spermatozoa dari kerusakan. Ion natrium dan kalium yang terdapat dalam plasma seminalis berperan penting dalam menjaga integritas fungsional membran plasma spermatozoa, sedangkan protein berperan penting dalam melindungi membran plasma agar tetap lentur dan merupakan jaket bagi spermatozoa dari kerusakan irreversibel, sedangkan asam askorbat berperan sebagai zat antioksidan yang penting untuk melindungi spermatozoa dari serangan senyawa oksigen reaktif hasil oksidasi spermatozoa (Beconi *et al.*, 1993 dan Choudhary *et al.*, 2010). Hilangnya plasma seminalis selama proses sentrifugasi gradien densitas percoll akan mengakibatkan perlindungan spermatozoa dari bahan-bahan perusak seperti serangan senyawa oksigen reaktif akan menjadi berkurang, sehingga spermatozoa mudah mengalami peroksidasi.

Identifikasi Rasio Spermatozoa X dan Y Kambing Setelah Perlakuan Pemisahan

Rata-rata rasio spermatozoa X dan Y yang diukur berdasarkan luas kepala spermatozoa setelah perlakuan pemisahan

dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dan kontrol dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rata-rata (\pm SD) Rasio Spermatozoa X dan Y pada Kambing Boer kontrol dan setelah perlakuan pemisahan

No	Perlakuan	Populasi Spermatozoa		Rasio Spermatozoa X/Y
		X	Y	
1	Kontrol	49,00 \pm 2,95 ^a	51,00 \pm 3,06 ^a	0,96
2	P1	63,60 \pm 2,95 ^b	34,40 \pm 2,95 ^b	1,85
3	P2	71,20 \pm 2,55 ^c	28,80 \pm 5,70 ^c	2,47
4	P3	23,80 \pm 5,34 ^d	76,20 \pm 3,15 ^d	0,30

Ket : - Superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa, spermatozoa X setelah perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol maupun *swim up* (P3). Persentase spermatozoa X pada kelompok perlakuan P2 lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol dan P3, akan tetapi lebih tinggi secara tidak nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan P1. Persentase spermatozoa X pada perlakuan P1 berbeda secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan P3 dan kontrol. Sedangkan perlakuan P3 tidak berbeda secara nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan kontrol.

Tingginya persentase spermatozoa X pada kelompok perlakuan sentrifugasi gradien densitas percoll, dapat disebabkan oleh berat dan ukuran spermatozoa X yang lebih besar serta kandungan DNA pada kepala spermatozoa X 3 – 4 kali lebih berat dari spermatozoa Y, sehingga dengan sentrifugasi gradien densitas percoll spermatozoa X akan lebih cepat membentuk endapan dibandingkan spermatozoa Y. Hasil penelitian Mirajuddin (1997) dan Check *et al.* (2000) menyatakan bahwa populasi spermatozoa X banyak didapatkan pada lapisan bawah karena mempunyai berat dan ukuran yang lebih besar daripada spermatozoa Y. Hasil yang hampir sama juga ditemukan pada penelitian Dasrul, 2005) pada spermatozoa kerbau lumpur, populasi spermatozoa X lebih banyak secara nyata pada lapisan bawah dibandingkan lapisan atas setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 5 tingkat

Angka Konsepsi dan Rasio jenis kelamin anak lahir

Angka konsepsi merupakan hasil penilaian terhadap daya fertilitas spermatozoa pada saat inseminasi dilakukan satu kali. Makin tinggi angka konsepsi yang diperoleh makin tinggi daya fertilitas spermatozoa tersebut. Rata-rata angka konsepsi pada inseminasi pertama dengan menggunakan spermatozoa hasil pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat dilihat pada Tabel 4

Tabel. 4. Angka konsepsi (CR) setelah Inseminasi dengan spermatozoa berbagai perlakuan pemisahan dan kontrol

No	Perlakuan	Jumlah Betina IB	Angka Konsepsi		C/R
			Bunting	Tidak Bunting	
1	Kontrol	5	3	2	60 % ^a
2	P1	4	3	1	75 % ^a
3	P2	4	4	0	100 % ^b
4	P3	4	4	0	100 % ^b
Jumlah		17	14	3	82,35 %

Ket : - Superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$).

Dari Tabel 4 menunjukan bahwa persentase angka konsepsi pada IB pertama menggunakan spermatozoa hasil pemisahan menghasilkan angka konsepsi yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Hal ini membuktikan bahwa pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dan *swim up* dapat meningkatkan daya fertilitas spermatozoa. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Mirajuddin (1997), bahwa pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat memisahkan spermatozoa motil dengan immotil, sehingga dengan demikian memungkinkan spermatozoa tersebut lebih progresif. Selain itu proses sentrifugasi gradien densitas percoll dapat menginduksi terjadinya kapasitasi dan reaksi akrosom sehingga akan meningkatkan daya penetrasi spermatozoa pada sel telur (Samardzija *et al.*, 2006).

Hasil analisa statistik terhadap angka konsepsi antara semen kontrol dengan semen hasil pemisahan dengan sentrifugasi gradien

densitas percoll, menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0.05$). Sedangkan antara kontrol dengan fraksi semen bagian atas dan antara fraksi semen bagian atas dan bagian bawah, menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$). Adanya perbedaan angka konsepsi yang diperoleh pada penelitian ini disebabkan oleh adanya perbedaan kualitas spermatozoa diantara ketiga fraksi tersebut.

Rasio seks anak lahir hasil inseminasi dengan semen yang berasal dari hasil pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll lapisan atas dan bawah serta kelompok kontrol dapat dilihat pada Tabel 5

Tabel 5. Rasio seks anak yang dilahirkan hasil IB menggunakan spermatozoa hasil beberapa perlakuan pemisahan (%)

No	Perlakuan	Jumlah Anak	Jenis Kelamin Anak		Persentase anak Betina (%)
			Betina	Jantan	
1	Kontrol	5	3	2	60,00 ^a
2	P1	4	3	1	75,00 ^b
3	P2	5	4	1	80,00 ^b
4	P3	5	1	4	20,00 ^c
Jumlah		19	11	8	57,89

Ket : - Superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$).

Dari Tabel 5 terlihat bahwa dari 3 ekor induk yang melahirkan pada perlakuan kontrol diperoleh 5 ekor anak, 2 anak berjenis kelamin jantan (40 %) dan 3 ekor pedet betina (60 %), rasio seks tersebut tergolong normal. Pada perlakuan P1 dari 3 ekor induk yang melahirkan diperoleh 4 ekor pedet yang terdiri dari 3 ekor pedet betina (75,00 %) dan 1 ekor pedet jantan (25,00 %). Satu ekor induk diantaranya melahirkan anak kembar dua. Pada perlakuan P2 dari 4 ekor induk yang melahirkan diperoleh 5 ekor pedet yang terdiri dari 1 ekor pedet jantan (20.00 %) dan 4 ekor pedet betina (80.00 %). Pada perlakuan P3 dari 3 induk yang melahirkan diperoleh 5 ekor anak, 4 ekor anak berjenis kelamin jantan (80.00 %) dan 1 ekor pedet betina (20.00%) .

Tingginya persentase kelahiran anak betina setelah inseminasi dengan spermatozoa hasil sentrifugasi gradien densitas percoll mungkin merupakan indikasi bahwa proporsi spermatozoa X pada lapisan ini lebih banyak dari spermatozoa Y. Hal ini terjadi karena

spermatozoa X memiliki densitas dan berat yang lebih tinggi dibanding spermatozoa Y dengan demikian bila disentrifugasi akan lebih cepat turun ke lapisan bawah. Hal ini sesuai dengan pendapat Guzman *et al.* (2001) bahwa spermatozoa X mempunyai motilitas progresif yang lebih rendah dibanding dengan spermatozoa Y, karena massa dan bentuknya kepalanya lebih besar dan berat.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut;

1. Pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dan *swim up* dapat digunakan sebagai metode pemisahan spermatozoa X dan Y pada ternak kambing peranakan boer. Populasi spermatozoa X lebih banyak diperoleh setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll, sedangkan populasi spermatozoa Y lebih banyak diperoleh pada pemisahan dengan *swim up*.
2. Pemisahan spermatozoa X dan Y dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat menurunkan persentase motilitas dan integritas membran plasma utuh spermatozoa. Sedangkan pemisahan dengan *swim up* dapat meningkatkan persentase motilitas dan integritas membran plasma utuh spermatozoa kambing boer
3. Inseminasi menggunakan spermatozoa hasil pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dan *swim up* memberikan respon yang berbeda terhadap angka konsepsi ($P < 0,05$). Angka konsepsi dengan spermatozoa hasil pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dan *swim up* masing-masing adalah 75%; 100% dan 100%, lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (60%).
4. Inseminasi menggunakan fraksi spermatozoa hasil sentrifugasi gradien densitas percoll menghasilkan persentase kelahiran anak betina lebih banyak dari anak jantan. Sebaliknya inseminasi menggunakan fraksi spermatozoa hasil pemisahan dengan *swim up* menghasilkan anak berjenis kelamin jantan yang lebih

banyak dari anak betina. Rasio seks anak yang dilahirkan hasil pemisahan baik dengan sentrifugas, sedangkan peri gradien densitas percoll maupun dengan *swim up* berbeda dengan menggunakan semen kontrol ($P < 0,05$).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 2003. Petunjuk Penampungan, Produksi, Distribusi dan Evaluasi Semen Beku. Balai insiminasi buatan. Singosari. Malang.
- Beconi, M. T., C.R. Francia, N. G. Mora and M. A. Affranchino, 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 40: 841 - 851
- Brandeis, V. T. and M.T. Manuel. 1993. Effect of four methods of sperm preparation on the motile concentration, morphology and acrosome status of recovered sperm from normal semen samples. *J. Assists. Reprod Genet*; Aug: 10 (6): 409 – 416
- Check, M.L., C.R.A. Bollendorf, J.H. Check, W. Hourani, R. Long and M. McMonagle, 2000. Separation of sperm through a 12 layer percoll column decreases the percentage of sperm staining with quinacrine. *Arch. Androl* 44 (1); 47 – 50
- Choudhary, R. V.K Chawala, N.D. Soni, Jayant Kumar and R.K. Vyas 2010. Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility, *Pak J Physiol* 2010;6(2)
- Dasrul, Susilawati, M. Adam, A. Damhoeri dan Sunarti, 2000^a. Uji kualitas, Integritas membran spermatozoa kerbau lumpur hasil pemisahan dengan sentrifugasi gradien percoll dan filtrasi sephadeks. Laporan penelitian PHB VI tahun pertama. Universitas Syiah Kuala Banda Aceh.
- Dasrul, Susilawati dan Susanna, 2000^b. Pengaruh berbagai macam tehnik pemisahan terhadap integritas membrane spermatozoa kerbau lumpur, Prosseding

- Seminar Bioteknologi Reproduksi Brawijaya Universitas Malang Malang
- Dasrul, 2002. Uji kualitas, Integritas membran spermatozoa kerbau lumpur hasil pemisahan dengan sentrifugasi, sentrifugasi gradien percoll dan filtrasi sephadexs. *Prosseding Seminar Bioteknologi Reproduksi Universitas Airlangga Surabaya*.
- Dasrul, 2005. Peran Senyawa Oksigen Reaktif Dalam Mekanisme Kerusakan Integritas Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur Hasil Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll. Disertasi Ilmu Kedokteran Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Surabaya
- De Jonge, C. 2005. Biological basis for human capacitation, Human Reproduction Update, Vol.11, No.3 pp. 205–214, 2005
- Guzman, E.G., M. Ollero, M.C. Lopez, R.K. Sharma, J.g. Alvarez, A.J. Thomas and A. Agarwal. 2001. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum. Reprod.* Vol. 16.9. : 1922 – 1930
- Hafez, E.S.E. 2004. X- and Y-Chromosome-Bearing Spermatozoa dalam Reproduction in Farm Animal, 8th ed. Lea & Febiger Philadelphia, USA pp 440 – 446
- Hossefien de Lima, V.F.M., M.D.T. Ramaldo, L.H. Rodrigues, E.B. Malheiros and C.A. Moreira – Filho, 1999. Seperation of X- and Y-bearing buffalo spermatozoa by percoll density gradient centrifugation. *Theriogenology*. 53:479-80
- Kaneko, S.,J. Yanagimachi, T. Kobayashi, and R. Lizuka, 1983. Separation of human X and Y Bearing sperm using percoll density gradien centrifugation, *Fertil and Steril*, 40
- Mirajuddin, 1997. Pengaruh Preparasi sperma dengan metode sentrifugasi gradient densitas percoll dan swim up terhadap kualitas spermatozoa dan angka konsepsi pada kambing PE, Tesis Pascasarjana Unair Surabaya.
- Safei, S. 1990. Pemisahan spermatozoa X dan Y dengan memakai Percoll. Dari hati sampai ke mata disunting oleh Jamal. Pusat Penelitian Andalas Padang.
- Samardžija, M, T. Dobranić, M. Karadjole, Iva Getz, S. Vince, D. Gračner, N. Maćešić, and I. Filaković. 2006. The efficacy of gradient Percoll[®] on bull sperm separation for *in vitro* fertilization. *Veterinarski Arhiv* 76 (1), 37-44
- Steel, R.G.D and Torrie. 1990. *Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik*. Alih Bahasa Bambang Sumantri. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Susilawati, 2000. Analisis membran spermatozoa sapi hasil filtrasi sephadexs dan sentrifugasi gradien densitas percoll pada proses seleksi jenis kelamin. Disertasi Pascasarjana Unair Surabaya
- Zenichiro. K. Herlantien, Sarastina, 2002. Intruksi Praktis Teknologi Prosessing Semen Beku Pada Sapi, Jica - BIB Singosari, Malang.